

学 位 論 文 題 名

Photoelectric Studies of Organized Bacteriorhodopsin
Films at the Solid/Liquid Interface.

(固/液界面でのバクテリオロドプシン薄膜からの光電応答とその機構)

学位論文内容の要旨

バクテリオロドプシン光電変換素子

高度高塩菌が産生する感光性のタンパク質、バクテリオロドプシン(BR)を透明電極に担持させた、透明電極/BR薄膜/電解質溶液/対極という構成の電気化学セルに可視光を照射することで電流応答を取り出すことに成功した(*Science*, **255** 342 (1992))。この応答は光強度変化の差分のみに反応し、光入力が微分演算された「微分応答」である特徴を持つ。この微分応答性は脊椎動物の視細胞における視覚認識の基本であるところから、動画の検出、画像の輪郭の抽出といった視覚情報処理能力をもった光センサーの開発が可能となった。そこでBRを担持する透明電極を256画素からなるピクセルネットワークに加工し、各画素の光電応答を二次元情報として並列に出力できる画像センサーを試作した結果、動画像と輪郭像の抽出を受光の窓口で即時に実行することを検証した(*Appl. Opt.*, **32** 6371 (1993))。このセンサーは世界初の生物材料を利用した画像センサーのプロトタイプとなった。

BR薄膜の配向解析

BRの本来の機能がベクトルの(光エネルギーを利用してプロトンを細胞質側から細胞外側に輸送)であることから電極上でのBRの配向が光電応答に影響を与えると予想される。このため電極表面に向いているBRが細胞内側(C-末端側)なのか、外側(N-末端側)なのか、あるいはランダムに配向しているのかを解析した。この解析の手段として抗体のもつ認識能を利用した。すなわち、BRのC-末端側、あるいはN-末端側を認識するモノクローナル抗体を作製し、これらをプローブとしてBRの表裏存在率を定量することを試みた。ここで用いたBRの表裏測定法は、BRの細胞内側もしくは外側を認識するモノクローナル抗体を粒径既知のコロイド金でラベルし、電頭グリッドに付着したBRをこのコロイド金修飾抗体で染色し、これを電子顕微鏡で観察することを原理としている。結果は、グリッド上のBRの露出面がコロイド金で覆われた膜断片とそうでない断片を明瞭に染め分けることに成功したが、BRの配向はほぼランダムであることが判明した(*FEBS Lett.*, **324** 287 (1993))。

BR薄膜の配向制御

なぜランダムなBR薄膜から応答が得られるかを考える前に、配向を制御した薄膜からの応答はどのようなものか興味があった。われわれはBispecific(BS)抗体という特殊な抗体を作製することでBRの配向を精密に制御することを試みた。抗体がもともと2価であることを利用して、BRのアミノ末端基、もしくはカルボキシル末端基と基板表面を同時に認識するBS抗体を化学修飾技術を使って2種類化学合成し、このBS抗体を架橋剤としてBRをアミノ末端側、もしくはカルボキシル末端側から電極表面に配向固定した。本方法を用いることでBR薄膜を任意の方向に固定化するこ

とが可能になった。このようにして作製した2種類の配向膜を使ってセルを作り、BR膜1層から得られる光電応答特性を比較した。その結果、どちらの配向膜も逆方向の応答は得られず、程度の差はあるものの、どちらの配向膜からも正方向の応答を与えた (*Science*, 265 762 (1994))。

バクテリオロドプシン光電変換素子の応答機構

なぜBRがこのような特異的な光応答(微分応答)を示すのか、なぜランダム配向膜から応答ができるのか、さらに光電応答がBRの光反応サイクルのどの段階に対応しているのかという機構上の問題を分子レベルで解明し、そのオリジンが何かを明らかにすることを目的とし、以下の結果を得た。

1. 明時、暗時の応答強度比較により、バクテリオロドプシンが全トランス型のレチナール構造を有しているときのみ応答を与えた。この事実はBRの光応答は光反応サイクル内部のイベントを反映していることを意味する (*Photochem. Photobiol.*, in press (1997))。

2. 高速のパルスレーザーを用いる実験で応答速度は約100 μ sと算定され、この時定数はタンパク質がプロトンを放出するときの時定数と一致した。

3. 高電圧フォトマル回路を併用することで高速応答とタンパク質の吸収変化を同時に測定できるシステムを構築し、タンパク質がプロトン放出時に示す際の特有の吸収(410 nm)を持つ中間体(M中間体)の生成と減衰と応答が一致することを明らかにした。

4. 約20種類の変異タンパク質からの応答を比較し、プロトンの放出と取り込みに関わるアミノ酸残基の変異が応答プロファイルに大きな影響を与えることが判明した。例えば、最近Glu-204(204番目のグルタミン酸)が細胞外側でプロトン放出に直接関係していると同定されたが、このアミノ酸残基を中性のグルタミン(Gln-204)に変異させたBRからの応答の方向は、完全に野生株BRと逆転する。このことはBR(Gln-204)には光照射時に放出されるべきプロトンが存在せず、プロトン取り込みが優先し、これが逆応答をもたらす。

結局、トータルの応答機構として、光照射によりタンパク質がプロトンを放出したり取り込んだりする過程を電極界面が感知し(電極界面のpHが下がると応答の方向は正に、pHが上がると方向は負)、電極内部で生じた変位電流を検出していると結論できる。従って、本研究での電気化学セルは電極近傍での微小なpH変化をとらえることにより電極内部に一種の容量電流を発生させると考えられる。この機構はランダム膜から応答が得られることと矛盾しない。電極近傍のpH変化は膜の配向に依存せず、タンパク質からのプロトン放出(pH↓)と取り込み(pH↑)にのみ依存するからである。

本研究によって、バクテリオロドプシン由来の光電応答の機構を明らかにできたと同時に光電応答を測定することで、タンパク質自身の機構解明にも有用であることを示すことができた。本研究は学術的には他のイオン輸送タンパク質の機構解明に有用な手段となりうるし、本研究で示した微分応答性は視覚の基本機能でもあり、本研究にさらに工学的観点を付与して真の人工網膜開発へ進展することが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 茂 直 樹
副 査 教 授 栗 原 堅 三
副 査 助 教 授 三 宅 教 尚
副 査 講 師 宮 内 正 二

学 位 論 文 題 名

Photoelectric Studies of Organized Bacteriorhodopsin Films at the Solid/Liquid Interface.

(固／液界面でのバクテリオロドプシン薄膜からの光電応答とその機構)

高度好塩菌 *Halobacterium salinarium* は極めて塩濃度の高い環境でのみ生育する古細菌の一種であるが、この細菌はその細胞膜に、動物の網膜の視物質であるロドプシンとよく似たタンパクが発現している。このタンパク質はバクテリオロドプシン (b R) と呼ばれ、*Hb. salinarium* の細胞膜上に二次元結晶状態で配列している。b R は可視光照射によってプロトンを細胞内から外へくみ出すプロトンポンプとして働き、光によるこの細菌の ATP 合成に寄与している。b R は 1 分子が「分子機械」として機能しており、同じく太陽エネルギーを利用するクロロフィル系に比べて、はるかに簡単なシステムである。b R は生物材料として極めて安定でかつ単離・精製が容易なため、生物的光電素子として優れている。

申請者は透明電極 (ガラス板に SnO_2 をコートしてある) 上に b R の薄膜を固定化し、これと対極との間に電解質をサンドイッチした電気化学セルを構成した。これに可視光を照射すると、入射光量にはそのまま追随せず、光量変化があったときのみ応答する、いわゆる時間微分型の応答を示した。この応答特性は脊椎動物の網膜で見られる特徴的な光信号と類似の特性を示すことから、本セルを 256 画素に拡張した二次元センサーを作成した。このセンサーは、光入力による網膜内の神経細胞の動画抽出、輪郭強調等の視覚情報処理機能を有することが示された。

b R がその機能において方向性を持っているために、光電応答挙動は電極上の b R の配向状態に大きく影響を受けるはずである。従って、b R の配向を調べる方法の開発が必要となり、N 末端および C 末端の合成ペプチドを抗原とするモノクローナル抗体とコロイド金を用いた方法を開発し、透明電

極上の b R の配向はランダムであることを明らかにした。

b R の配向と応答の関係を明らかにする目的で、b R を精密に配向させる方法の開発に取り組んだ。申請者はこの目的のため Bispecific (BS) 抗体を用いた。抗体がもともと 2 価であることを利用して、b R の N 末端もしくは C 末端と基板表面（ジニトロフェノール付加している）を同時に認識する BS 抗体を化学修飾技術を使って化学合成した。この BS 抗体を架橋剤として、b R を配向させた。上記の方法で配向を調べたところ、殆ど完全に b R の配向が制御されていることが分かった。このように b R の配向を制御した 2 種類のセルの光応答を調べた。その結果は、N 端を電極基板に向けて配向させたサンプルの方が大きな応答が得られたが、逆方向に配向させたサンプルからも同方向の応答が得られた。これは不思議な現象であった。

なぜ、応答が配向に依存しないのか、また、ひるがえってこのセルにおける電気応答の機構は何なのかを研究した。パルスレーザー照射後の b R からのプロトン放出・吸収がおこる時間は過去の多くの研究によって明らかにされている。そこで、このセルにパルスレーザー光を照射し、電氣的応答の時間経過を測定した。パルス光によって電気応答が変化する方向を正の方向とすると、微分応答であるから照射が切られると反対方向の電気応答（負の応答）が観測される。応答の立ち上がり速度（正の応答）は約 $100\ \mu\text{s}$ で、これはパルス光照射後、b R からプロトンが放出される時間によい対応を示した。

多くの組み替え体 b R が作成され、その光化学反応及び光駆動プロトン輸送能等が測定され、b R のプロトン輸送の分子機構が解明されつつある。そこで、申請者は種々の（20 種の）変異体を用いて、本電気化学セルの光応答を調べた。これらの変異体は、光照射によってプロトンをタンパク質から放出しないもの、放出はするが吸収の過程が極めて遅いもの、及び放出と吸収の順序が野生型とは逆のもの等である。これらの変異体固定セルの実験結果および応答速度の測定から、電気応答の機構を次のように推定している。すなわち、正の方向の応答は b R から放出されたプロトンの影響で電極近傍の pH が下がることに基つき、負の方向の応答はプロトンが b R 内部に取り込まれるために pH が上昇するためである。本研究での電気化学セルは電極近傍での微少な pH 変化を捉えることにより、電極内部に一種の容量電流を発生させると結論している。また、この実験の成果として、野生型 b R のプロトン放出に直接関与するアミノ酸残基の同定にも成功している。

本学位論文は、8 章からなる 86 ページの英語論文である。本論文の審査の結果、申請者に博士（薬学）を授与するに十分であると認めた。